



Drosophila subobscuraにおける求愛行動の視覚性制御とその神経基盤に関する研究

| | |
|--------|---|
| 著者 | 樋口 智大 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| 学位授与番号 | 11301甲第18781号 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/00125743 |

博士論文（要約）

Drosophila subobscura における求愛行動の視覚性制御と

その神経基盤に関する研究

平成 30 年度

東北大学大学院生命科学研究科

生命機能科学専攻

樋口 智大

動物の行動は種によって多様である。たとえそれが本能行動のように遺伝的にプログラムされた行動であっても、実際に動物が示す行動には幅広い多様性が認められる。しかし、このような多様性が神経系のどのような違いによって生まれるのかはほとんど明らかになっていない。本研究では、ショウジョウバエ属の求愛行動に着目し、非モデル種 *Drosophila subobscura* とモデル種キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* との間で求愛行動の神経機構を比較することで、行動の種間差を生み出す神経メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。

モデル種キイロショウジョウバエでは、豊富な分子遺伝学的ツールを用いた多くの先行研究から、性決定遺伝子 *fruitless(fru)* 発現神経細胞群の1つである脳の P1 介在神経細胞群が雄の求愛行動制御の中軸をなすことや、P1 に収斂して求愛を惹起する感覚刺激の入力経路など、この行動の基盤をなす神経回路に関する多くの発見がなされている。また、それらの解明を実現する手法も蓄積している。これらの知見は、非モデル種の求愛行動研究へ応用可能であると期待される。

本研究で取り上げる非モデル種 *D. subobscura* の求愛行動は、キイロショウジョウバエとは大きく様式が異なり、また視覚に高い依存性を示す点でも固有である。従って、視覚情報処理に着目して *D. subobscura* の求愛行動の神経機構を調べることで、*D. subobscura* とキイロショウジョウバエの行動様式の種間差を生む神経回路の差異を明らかにできる可能性があると考えた。

そこで本研究では、キイロショウジョウバエで確立された、感覚運動制御の定量的解析手法を *D. subobscura* に適用することを試みた。具体的には、トレッドミル装置上に拘束した雄を用いて、求愛行動の諸要素がどのような視覚刺激によって惹起されるのかを明らかにすることにした。その上で、刺激の入力から行動の生成に至る機構を探る端緒として、カルシウム濃度感受性蛍光色素 GCaMP6s を導入した *D. subobscura* 形質転換体の作出、それを用いての神経活動 *in vivo* カルシウムイメージングを試みた。こうして、*D. subobscura* の *fru* 発現神経細胞群の視覚刺激に対する応答性を調べ、得られた知見をキイロショウジョウバエの知見と比較することで、求愛行動の種間差を生む神経基盤の違いの解明を目指した。

本論文は、以下の全7章からなる。

【第1章 序論】

この章では、上述の内容を含む研究背景について詳説している。

【第2章 材料と方法】

この章では、下記の第3章の実験に用いた材料と方法について述べている。

2-1 節では、被験体として使用した *D. subobscura*、キイロショウジョウバエの入手元、その飼育方法について

て説明している。

2-2 節は、トレッドミル装置を用いた拘束条件下での求愛行動解析の手法の説明である。その中で、装置の仕様、視覚刺激の呈示方法、行動反応の評価法について述べている。

2-3 節では、トレッドミルを用いない自由行動下での求愛行動解析における、行動の記録法とその評価方法について説明している。

2-4 節では、*D. subobscura* の *fru* 発現神経細胞群を対象とした *in vivo* カルシウムイメージングの方法について解説している。GCaMP6s を導入した形質転換体の作出法、免疫組織化学、*in vivo* カルシウムイメージングの方法と、データ解析の方法について述べている。

【第3章 結果】

この章では、第2章の方法によって得られた結果をまとめている。本研究の実験は3つに大別される。それぞれ実験結果の要約は以下の通りである。また、見出し横の括弧内は対応する節を表す。

1. トレッドミル装置を用いた行動解析系の確立 (3-1 節)

キイロショウジョウバエの行動研究で使われているトレッドミル装置に、リニアアクチュエーターまたはPCモニターを用いた視覚刺激呈示装置を組み合わせた実験系を作成した。これにより、拘束条件下にある *D. subobscura* の雄（拘束雄）に対して様々な視覚刺激を再現性よく呈示し、これによって生じる行動反応を歩行パターンとビデオ画像として記録できるようになった。この実験系を利用して、拘束雄の目の前で雌を左右方向に反復移動させることにより、求愛行動を構成する複数の行動要素、即ちタッピング、手まねき運動、口吻伸展、両翅展開、追跡行動を惹起できることがわかった。これにより、視覚刺激と求愛行動との関係を定量的に解析することが可能になった。

2. 求愛行動要素を惹起する視覚刺激パターンの探索 (3-2 節～3-5 節)

水平方向の移動と停止を繰り返す視覚ターゲットを拘束雄に対して呈示し、引き起こされた求愛行動要素の生起タイミングを解析した。その結果、タッピングはターゲットの移動中に、手まねき運動はターゲットの停止直後に、口吻伸展はターゲットの停止から約3秒後にそれぞれ生起頻度が高くなる傾向があった。このことから、個々の求愛行動要素の惹起には、異なる視覚要素が重要であることが示唆された。

また、PCモニター上に表示したコンピューターグラフィックスを用いて、拘束雄の求愛行動の惹起を試み、明暗の縞模様を水平方向に反復移動させる刺激パターンを拘束雄に対して呈示することで、活発なタッピングが生じることを見出した。次に、この縞模様の刺激のパラメーターをさまざまに変え、それがタッピング活性

に及ぼす影響を検討した。その結果、縞模様を動かす速度と方向、そして縞模様を呈示する視野領域の「縦の長さ」がタッピングの生起頻度に寄与することが明らかになった。これらの結果を元に縞模様刺激を調整し、自由行動下で観察されるよりもはるかに高い頻度でタッピングを惹起することに成功した。

3. 視覚刺激および雌への接触に対する *fruitless* 発現神経細胞群の応答特性 (3-6 節, 3-7 節)

求愛行動の惹起にかかわる視覚刺激に対して、*D. subobscura* の介在神経細胞が示す応答を *in vivo* カルシウムイメージングを用いて検討した。この目的の下、まず GAL4/UAS システムを用いてカルシウム濃度感受性蛍光色素 GCaMP6s を発現させるための形質転換系統 *UAS-GCaMP6s* を作成し、*D. subobscura* で初めて *in vivo* カルシウムイメージングを行うことを可能にした。

続いて、性決定遺伝子 *fruitless(fru)* の転写制御領域に *GAL4* 配列が挿入されたドライバー系統 *sub-fru-GAL4* を用いて GCaMP6s を *fru* 発現神経細胞群に発現させ、イメージング実験を行った。クチクラを一部切除し、蛍光顕微鏡で脳を観察できるようにした雄をトレッドミル上に配置し、コンピュータディスプレイ上の視覚刺激を被験雄に呈示した。その結果、水平方向に縞模様を動かしている間に、外側前大脳と視神経結節の周辺でカルシウム応答が生じた。同じ縞模様を動かさずに PC モニター上に表示しただけでは実質上、カルシウム応答は生じなかった。このことから、*D. subobscura* では求愛行動を惹起することのできる視覚刺激に対して、外側前大脳と視神経結節領域に存在する *fru* 発現神経細胞群が応答することが示唆された。一方、同じく *fru* 発現神経細胞群に GCaMP6s を発現させたキイロショウジョウバエで同様の記録を行ったところ、縞模様を動かしている間に応答はみられなかった。この結果から、*D. subobscura* とキイロショウジョウバエでは、同一の視覚刺激に対する *fru* 発現神経細胞群の応答性に違いがある可能性が示唆された。

先行研究では、キイロショウジョウバエの雄が雌の腹部に接触すると、外側前大脳にカルシウム応答が生じることがわかっている。これと同じ応答が *D. subobscura* でも生じるかを検討した。その結果 *D. subobscura* の雄が雌の腹部に触れたときのカルシウム応答は、キイロショウジョウバエよりも有意に小さかった。このことから、雌への接触に対する *fru* 発現神経細胞群の応答性にも差異があると考えられた。

以上のことから、この領域の *fru* 発現神経細胞群は、*D. subobscura* では視覚、キイロショウジョウバエでは接触化学感覚というように、それぞれの種の求愛行動惹起の鍵刺激に対して高い応答性を示すことを明らかにした。

【第4章 考察】

この章では、実験結果を踏まえた考察を述べている。その要約は以下の通りである。

本研究では、キイロショウジョウバエの求愛行動研究で利用されていたトレッドミル装置を *D. subobscura* に適用すべく改良し、同種で求愛行動と視覚刺激の関係を調べる実験系を確立した。また、この装置を使って、視覚刺激が求愛行動惹起に与える作用を検討し、人工的な刺激を用いてタッピングを高頻度で惹起することに成功した。また、GCaMP6s を導入した形質転換体を作出し、求愛行動に関わる刺激に対して *D. subobscura* の *fru* 発現神経細胞群が示すカルシウム応答の記録に成功した。

D. subobscura を用いたイメージング実験では、外側前大脳から視覚性の応答が記録された。キイロショウジョウバエにおいて、外側前大脳には P1 神経細胞群が密な分枝を広げていることから、今回 *D. subobscura* で記録されたカルシウム応答が P1 神経細胞群由来である可能性が考えられる。より少数の *fru* 発現神経細胞群に限定して GCaMP6s を発現するモザイク個体を用いるなどして、現在着目している応答がどの神経細胞群で生じているのかを同定するのが今後の大きな課題であると言える。この点を明らかにすることにより、*D. subobscura* とキイロショウジョウバエの間で、求愛行動の発現制御の神経機構を同定介在神経細胞群の特性に基づいて議論することが可能になると考えられる。

本研究から、外側前大脳の *fru* 発現神経細胞群を強く活性化する感覚刺激が種によって異なることが示唆された。この違いが生じる理由として、低次の感覚神経細胞群の応答性がそもそも違う可能性と、高次の神経細胞群に至るまでの神経経路が異なる可能性の 2 つが考えられる。これを検討するためには、外側前大脳の *fru* 発現神経細胞群に inputs する神経細胞群の形態・機能の同定が必要である。これらを詳しく調べ、キイロショウジョウバエと比較することで、求愛行動の感覚性制御の種間差がいかんにして生み出されるかを、神経回路レベルで明らかにできると期待される。

【第 5 章～第 7 章】

第 5 章は引用文献のリスト、第 6 章は謝辞である。

また、第 7 章は第 2 章・第 3 章の図表・資料である。図 1～図 4、資料 1 は第 2 章、図 5～図 10、表 1 は第 3 章と対応している。